Изменение Электрофоретических Спектров Антиоксидантных Ферментов Пшеницы, Подвергнутых Почвенной Засухе

И.М. Гусейнова, Д.Р. Алиева, Д.А. Алиев
Институт ботаники НАН Азербайджана, Бадамдарское шоссе, 40, Баку AZ 1073, Азербайджан; E-mail: huseynova-i@botany-az.org

У шести контрастных генотипов мягкой (*Triticum aestivum* L.) и твердой (*Triticum durum* Desf.) пшеницы были проведены эксперименты с растениями, выращенные в полевых условиях с целью изучения влияния почвенной засухи на активность антиоксидантных ферментов листьев. Методом нативного электрофореза в ПААГ обнаружено присутствие одной изоформы каталазы, 6 изоформ супероксиддисмутазы, 7 изоформ аскорбатпероксидазы и 7 изоформ глутатионредуктазы в листьях пшеницы во время засухи. Показано, что в растениях пшеницы функционируют три типа изоформ одного из ключевых антиоксидантных ферментов супероксиддисмутазы: Mn-, Fe-, Cu/Zn-содержащие СОД. Сделан вывод, что засуха приводит к увеличению активности АПО, СОД, КАТ и ГТР в листьях пшеницы по сравнению с исходным уровнем. Наиболее заметно увеличивается активность АПО и ГТР, что указывает на интенсивную работу аскорбат-глутатионового цикла, в котором происходит разрушение H_2O_2.

Ключевые слова: пшеница, засуха, ферменты антиоксидантной защиты

ВВЕДЕНИЕ

Растения живут в постоянно изменяющихся условиях внешней среды, подвергаются действию различных факторов абиотической и биотической природы. Им приходится адаптироваться к этим факторами формировать механизмы противодействия их негативному влиянию. Одной из центральных проблем современной биологии растений является исследование генетически контролируемых механизмов устойчивости растений к различным стрессам. Засуха относится к одному из самых распространённых и критически значимых для растений неблагоприятных факторов окружающей среды, вызывающих резкое снижение продуктивности многих сельскохозяйственных культур (Abedi and Pakniyat, 2010; Passioura and Angus, 2010; Aliyev, 2012). При резком недостатке воды в почве задерживается биосинтез органических соединений и усиливается гидролиз, в результате чего нарушаются ростовые процессы (Sayar et al, 2008; Tas and Tas, 2007; Khan and Naqvi, 2010). Почвенная засуха также может способствовать генерации активных форм кислорода (АФК), особенно, если она сопровождается высокой солнечной инсоляцией (Fu and Huang, 2001). Образование АФК особенно интенсивно протекает в хлоропластах в результате нарушения баланса между скоростью переноса электронов и скоростью фиксации углекислого газа. В зависимости от водообеспеченности листьев устьица закрываются полностью или частично, чтобы избежать избыточной потери воды. Тем самым, снижается внутриклеточная концентрация углекислого газа. При этом исследование, проведенное Николаевой с соавт. (Николаева и др., 2010), показало, что почвенная засуха не вызывала существенных изменений активности ферредоксин-НАДФ$^+$-оксидоредуктазы, фермента, связанного с ФСI и осуществляющего перенос электронов от восстановленного ферродоксина к НАДФ. Соотношение между накоплением фотохимически неактивных реакционных центров ФСI и ФСII практически не изменялось, что свидетельствует о стабильности функционирования электрон-транспортной цепи хлоропластов. Эти условия вызывают усиленное образование активных форм кислорода, таких как супероксид-радикал (O_2^-), гидроксил-радикал (OH^-) и перекись водорода (H_2O_2), активирующих антиоксидантные ферменты. Содержание АФК находится под многоуровневым контролем ферментов антиоксидантной системы. Одним из показателей биологической устойчивости растений к постоянно меняющимся условиям внешней среды является изменение активности и множественных молекулярных форм антиоксидантных ферментов. Основную роль в элиминации АФК играют супероксиддисмутаза, которая снижает концентрацию супероксида (Мерзляк, 1989), а также каталаза, пероксидаза и ферменты, включенные в аскорбат – глутатионовый цикл, устраняющие избыток перекисей (Scandalios, 1993). В связи с выявлением четкой зависимости устойчивости к засухе от содержания осмотиков в последние годы используется введение в геном растений генов, кодирующих энзимы, которые катализируют образование осмотически активных продуктов. Например, трансгенные растения, у которых удалось экспрессировать СОД,

оказались более толерантными к дефициту воды (Chatzidimitriadou et al., 2009).

Пшеница важнейшая сельскохозяйственная культура, часто подвергается действию различных стрессов, таких как засуха, засоление и экстремальные температуры, которые приводят к дезорганизации мембран, проявлению токсичности ионов и окислительному стрессу (Asish and Das, 2005; Al-Ghamdi, 2009; Aliyev, 2001). Функционирование главного звена антиоксидантной системы в условиях засухи у растений, отличающиеся устойчивостью к этому стрессу в различные фазы вегетации пока далеко от полного понимания.

Исходя из вышесказанного, целью данной работы являлось изучение на электрофоретических спектров антиоксидантных ферментов, включая супероксиддисмутазу (СОД), каталазу (КАТ), аскорбатпероксидазу (АПО) и глутатионредуктазу (ГТР) в листьях пшеницы при влияния почвенной засухи

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

При изучении молекулярных механизмов, приводящих к изменениям в клетках во время действия различных стрессов, удобным объектом являются суспензионные культуры клеток. Поэтому в данной работе были использованы культуры клеток 6 контрастных генотипов твердой (*Triticum durum* Desf.) и мягкой (*Triticum aestivum* L.) пшеницы, взятые из Генбанка Научно-исследовательского института земледелия Азербайджана: устойчивые генотипы –Азаматли-95, Баракатли-95, Гырмызы бугда и чувствительные генотипы - Гарагылчыг-2, Гырмызы гюль-1, Гийматли-2/17 (Рис. 1). Использование именно такой модельной системы позволило изучить динамику активности антиоксидантных ферментов в самые ранние этапы засухи. Контролем служили растения пшеницы, не подвергавшиеся действию стрессовых факторов. Растения были выращены в полевых условиях при нормальном водообеспечении и в условиях засухи.

Все процедуры проводили при температуре 0-4°С. Листья отделяли от проростков, брали навеску 0,5 г (сырой массы) и растирали в ступке, содержавшей 5 мл 50 мМ фосфатного буфера. Гомогенат фильтровали через 4 слоя марли и затем центрифугировали при 15000 g при 4°С в течение 15 мин. Полученный супернатант использовали для анализа ферментов.

Для анализа были выбраны ключевые ферменты системы защиты растений от окислительного стресса: супероксиддисмутаза (СОД, КФ 1.15.1.1), аскорбатпероксидаза (АПО, КФ 1.11.1.11), глутатионредуктаза (ГТР, КФ 1.6.4.2) и каталаза (КАТ, КФ 1.11.1.6). Качественное изменение активности ферментов исследовали путем гель-электрофореза в нативном полиакриламидном геле (ПААГ) по методу Леммли (Laemmli, 1970) с некоторыми модификациями. Равное количество ферментного экстракта смешивали с бромфеноловым синим и глицерином до конечной концентрации 12,5% (v/v). Электрофорез проводили на 7%-ном (для КАТ) и 10%-ном (для АПО, СОД и ГТР) ПААГ толщиной 0,75 мм, длиной 16 см. Электрофорез был проведен при 4^{o}С 3 часа при стабильном токе 30 мА. Для проявления активности АПО 2 мМ аскорбат натрия добавлялся в электродный буфер.

Для визуализации линий каталазы гель инкубировали в растворе, содержащем 3,27 мМ H_2O_2 в течение 25 минут. Затем дважды промывали гель дистиллированной водой и окрашивали в свежеприготовленном растворе, содержащем 1% (w/v) $K_3[Fe(CN)_6]$ и 1% (w/v) $FeCl_3$ (Anderson et al., 1995).

Для визуализации аскорбатпероксидазы гель инкубировали в растворе, содержащем 50 мМ калий-фосфатный буфер (pH 7,0) и 2 мМ аскорбата-Na в течение 30 мин. Затем гель выдерживали в растворе, содержащем 50 мМ калий - фосфатного буфера (pH 7,0), 4 мМ аскорбата натрия и 2 мМ H_2O_2 в течение 20 мин. Затем, гель окрашивали в растворе, содержащем 50 мМ калий-фосфатного буфера (pH 7,8), 28 мМ ТЕМЕД и 2,45 мМ нитросинего тетразолия в течение 15 мин с перемешиванием на качалке (Mittler and Zilinskas, 1993).

Визуализацию изоформ СОД проводили по методу (Parida et al., 2004). Для этого гель инкубировали в 100 мл 1,0 М Трис-HCl буфере (pH 8,2), содержащем 10 мг нитросинего тетразолия, 75 мг ЭДТА-Na и 3 мг рибофлавина, в течение 30 минут в темноте. Затем гель выдерживали на свету до появления светлых полос на фиолетовом фоне.

Спектр изоферментов глутатионредуктазы визуализировали согласно модифицированному методу Рао с соавторами (Rao et al., 1996). Выявление изоформ происходило в результате реакции глутатиона, восстановленного глутатионредуктазой, с 3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2-тетразолиум бромидом и 2,6-дихлорофенолиндофенолом при покачивании в темноте в течение 1 часа.

Количество белков определяли по методу (Sedmak and Grossberg, 1977). Для построения калибровочной кривой использовали бычий сывороточный альбумин.

В работе представлены данные 3 опытов, проведенных в 3-кратной биологической повторности.



Рис. 1. Засухоустойчивые сорта пшеницы Отдела физиологии растений и биотехнологии Института земледелия.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Накопление АФК и активация антиоксидантных ферментов является результатом быстрых сигнальных реакций. Важно поддерживать способность к активному обезвреживанию АФК в условиях стресса для того, чтобы снизить повреждения, индуцируемые окислительным стрессом, особенно в листьях, которые являются основным местом фотосинтеза. Обезвоживание листьев пшеницы сопровождался накоплением H_20_2 и МДА, фазным изменением активности СОД, АПО, ГТР и КАТ, что свидетельствует о развитии окислительного стресса.

Супероксиддисмутаза является одним из ключевых компонентов системы защиты клеток от окислительного стресса. Этот фермент катализирует диспропорционирование супероксидных анион-радикалов до молекулярного кислорода и перекиси водорода. В процессе адаптации растений к окислительному стрессу уровень содержания СОД может увеличиваться в зависимости от вида растения, стадии его развития и степени стрессорного воздействия. Отличительной особенностью растительной супероксиддисмутазы является множественность изоферментов разных форм фермента.

Анализ изоферментных профилей в листьях 6 разных генотипов пшеницы, различающихся по засухоустойчивости, выявил шесть изоформ супероксиддимутазы, которые обозначены как 1-6 (Рис. 2А). При электрофоретическом разделении множественных молекулярных форм СОД не наблюдали видимых качественных различий (наличия дополнительных или отсутствия определенных полос на электрофореграмме). В обоих случаях (как при поливе, так и при засухе) были выявлены все 6 изоформ. При этом в изменении активности СОД никаких общих закономерностей не выявлено. Активность фермента снижалась в фазе колошения у генотипов Гарагылчыг-2, Азаматли-95, Гийматли-2/17, Баракатли-95. В восковой фазе и в фазе молочной спелости стимулировалась активность СОД засухоустойчивых генотипов Гырмызы бугда и Азаматли, тогда как активность фермента у устойчивого генотипа Баракатли-95 оставалась неизменным. Поскольку изоформы СОД отличаются разной устойчивостью к ингибиторам, определение типа изоформ было проведено с помощью ингибиторного анализа, который показал, что в растениях пшеницы содержаться три типа изоформ одного из ключевых антиоксидантных ферментов супероксиддисмутазы: Mn-, Fe-, Cu/Zn-содержащие СОД. (Рис. 2А). При этом Mn-СОД была представлена одной тонкой полосой, а Fe-СОД и Cu/Zn-СОД были представлены широкой полосой. Эффект «размытого» пятна на зимограммах обычно создают изоферменты, зоны которых в геле расположены очень близко. В нашем случае такой эффект создавали два близко расположенных изоформ Fe-СОД, и три Cu/Zn-СОД. Следует отметить, что множественность изоформ Cu/Zn-СОД является отличительной чертой клеток растений (Бараненко, 2006). Обработка гелей перекисью водорода, инактивирующей Cu/Zn-СОД и Fe-СОД, показала, что высокомолекулярная изоформа 1 представляет собой изоензим Mn-СОД, который сохраняет высокую активность во время засухи (Рис. 2Б). Ранее было доказано, что сильное увеличение как митохондриальной, так и пероксисомной изоформ Mn-СОД индуцируется в растительных тканях в условиях стресса (Racchi et al., 2001). Таким образом, можно предположить, что выявленная нами во всех исследованных образцах высокая активность Mn-СОД является следствием защиты от окислительного стресса в условиях почвенной засухи.

В литературе имеются данные о том, что при водном дефиците (Iturbe-Ormaetxe et al., 1998), солевом стрессе (Santos et al., 2001), в условиях засухи (Zhang et al., 1994) при достижении определенного уровня окислительного стресса происходит снижение активности СОД, в связи с тем, что при работе СОД образуется перекись водорода, которая является ингибитором фермента.

В результате реакции дисмутации, катализируемой СОД, образуется перекись водорода. Самыми распространенными ферментами, регулирующими уровень внутриклеточного содержания перекиси водорода, являются аскорбатпероксидаза и каталаза. Аскорбатпероксидаза является одним из ключевых компонентов системы защиты клеток от вредного воздействия H_2O_2. Она обнаружена во всех внутриклеточных компартментах – в цитозоле, хлоропластах, митохондриях, а также в тилакоидах растительной клетки (Mittler and Zilinskas, 1992; Bunkelman and Trelease, 1996; Ishikawa et al., 1996; Jimenes et al., 1998).

Из представленных данных видно, что среди исследованных ферментов на продолжительность действия засухи наиболее заметно реагирует аскорбатпероксидаза. При анализе электрофоретического спектра АПО листьев пшеницы в начале засухи (т. е. в фазе цветения) было обнаружено 4 изоформ (Рис. 3А). Почвенная засуха сопровождался увеличением изоформ АПО до 7 у обоих вариантов (при поливе и при засухе). Так как в восковой фазе наблюдали увеличение интенсивности высокомолекулярной изоформы и появление дополнительных 3 изоформ АПО (Рис. 3Б). Следует при этом отметить, что конститутивный уровень активно-

сти АПО был более высоким у устойчивых генотипов Азаматли-95 и Баракатли-95, чем у чувствительных. В то же время, кроме генотипа Гийматли-2/17, как у устойчивых, так и у восприимчивых сортов в конце засухи наблюдали повышение активности АПО по сравнению с контрольными вариантами, что вероятно связан с синтезом новых молекул фермента (т. е. он обусловлен изменением экспрессии генома при стрессе). Повышение активности фермента при стрессовых воздействиях может быть обусловлено активацией его латентных форм и/или синтезом новых молекул фермента. Так, одновременное увеличение активности АПО и количества соответствующих белков отмечено при солевом стрессе в хлоропластах гороха (Gomez et al, 2004), в листьях толерантного сорта томата *Lycopersicon penneli* (Mittova et al., 2003), хлоропластах пшеницы (Navari-Izzo et al., 1998), что свидетельствует об увеличении синтеза фермента в условиях действия стрессового фактора.

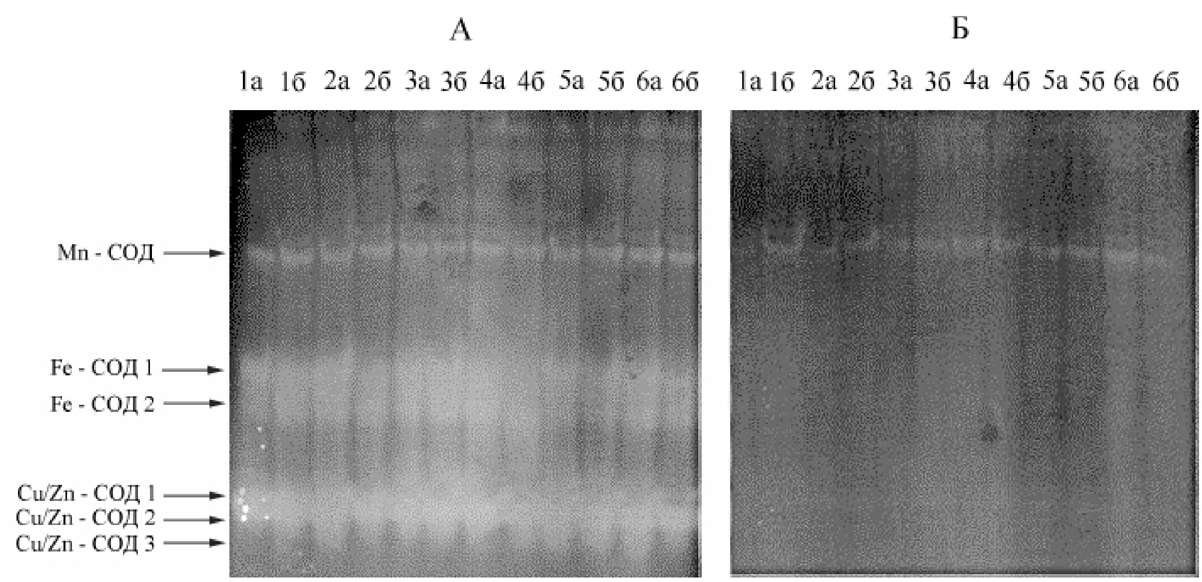


Рис. 2. Электрофоретические спектры супероксиддисмутазы (А) и влияние H_2O_2 на изоформенный состав супероксиддисмутазы (Б) листьев пшеницы, выращенных в условиях почвенной засухи. а – полив, б – засуха; 1 – Гарагылчыг-2, 2 – Гырмызы гюль-1, 3 – Азаматли-95, 4 - Гийматли-2/17, 5 – Баракатли-95, 6 – Гырмызы бугда. Электрофорез был проведен в 10%-ном ПААГ в трис-глициновом буфере (pH 8,3), при 4°C, 3 часа при стабильном токе 30 мА. Количество нанесенного белка составляло 45 мкг на дорожку геля.

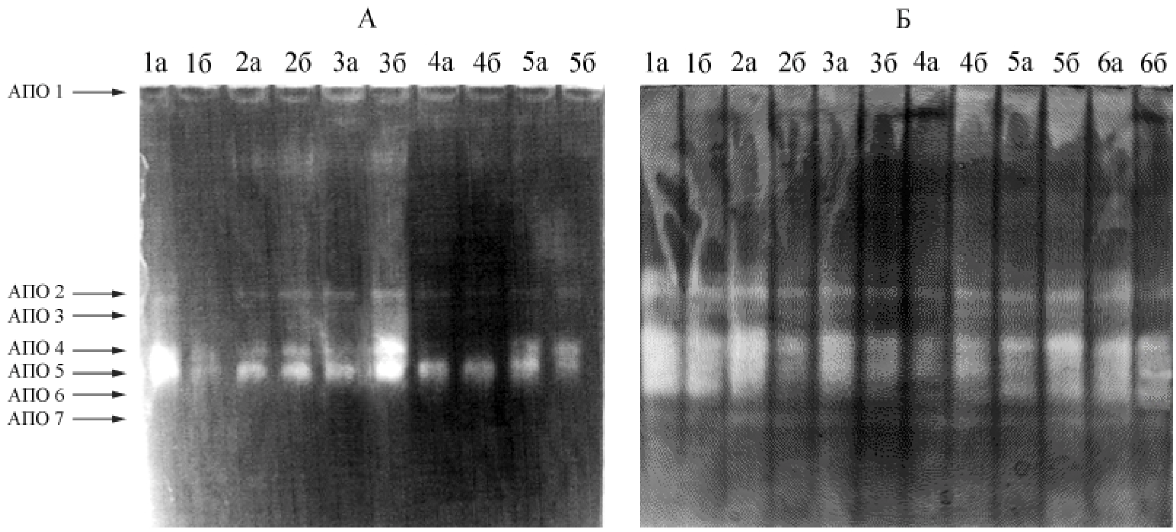


Рис. 3. Электрофоретические спектры аскорбатпероксидазы листьев пшеницы, выращенных в условиях почвенной засухи. а – полив, б – засуха; 1 – Гарагылчыг-2, 2 – Гырмызы гюль-1, 3 – Азаматли-95, 4 - Гийматли-2/17, 5 – Баракатли-95, 6 – Гырмызы бугда. Электрофорез был проведен в 10%-ном ПААГ в трис-глициновом буфере, pH 8,3 (с добавлением 2 мМ аскорбата натрия), при 4°C, 3 часа при стабильном токе 30 мА. Количество нанесенного белка составляло 35 мкг на дорожку геля.

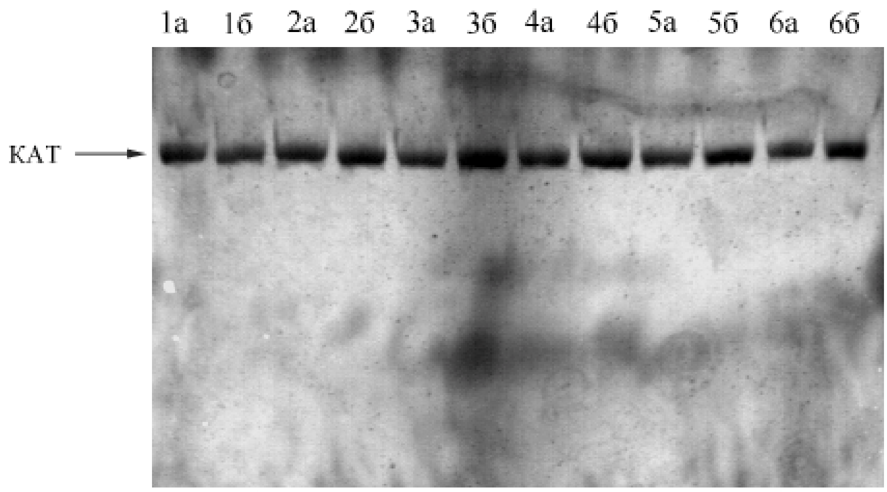


Рис. 4. Электрофоретические спектры каталазы листьев пшеницы, выращенных в условиях почвенной засухи. а – полив, б – засуха; 1 – Гарагылчыг-2, 2 – Гырмызы гюль-1, 3 – Азаматли-95, 4 - Гийматли-2/17, 5 – Баракатли-95, 6 – Гырмызы бугда. Электрофорез был проведен в 7%-ном ПААГ в Трис-глициновом буфере, pH 8,3, при 4°С, 3 часа при стабильном токе 30 мА. Количество нанесенного белка составляло 40 мкг на дорожку геля.

Отмеченное нами увеличение активности АПО в листьях пшеницы также может быть связано с повышением концентрации H_2O_2, которое приводит к активации фермента. Недавно было установлено, что активация экспрессии гена аскорбатпероксидазы *APX 2* в листьях арабидопсиса происходит с участием внеклеточного пула H_2O_2 (Bechtold et al., 2008). Повышение активности аскорбатпероксидазы при почвенной засухе свидетельствует о ее несомненном участии в антиоксидантной системе.

Каталаза, осуществляя согласованный механизм детоксификации на клеточном уровне, разрушает в организмах избыточное количество H_2O_2. В этом процессе реализуется ее важная защитная функция в живых организмах (Luna et al, 2004). При анализе изоферментного состава каталазы в листьях пшеницы выявлена одна форма фермента с высокой электрофоретической подвижностью, как у стрессовых, так и у контрольных вариантов, что соответствует литературным данным (Racchi et al., 2001). Недостаток влаги в почве весь период вегетации способствовал росту активности КАТ. Засуха активировал каталазу в листьях устойчивых генотипов пшеницы и мало влиял на активность этого фермента в листьях неустойчивых генотипов. При адаптации растений к условиям засухи наибольшая активность каталазы отмечена у засухоустойчивых сортов Азаматли-95, Баракатли-95 и Гырмызы бугда, а между другими сортами существенные различия не выявлены (Рис. 4). Следует также отметить, что у всех исследованных генотипов при долговременной почвенной засухе на фоне снижения активности СОД наблюдается увеличение активности КАТ и наоборот. Это вполне согласуется с данными литературы: в условиях водного стресса у засухоустойчивых генотипов мягкой и твердой пшеницы активность каталазы повышается, а у чувствительных - остается неизменной или снижается (Sairam et al., 2001; Zhang et al., 2000; El-Fadly et al., 2007).

В начале засухи электрофоретический спектр глутатионредуктазы содержит всего 3 изоформ у всех исследованных генотипов (ГТР2, ГТР3 и ГТР6) (Рис. 5А). Максимальный рост активности фермента и количество изоформ наблюдали в конце вегетации (Рис. 5Б). В результате исследования для всех исследуемых генотипов установлены семь форм фермента с разнообразной электрофоретической подвижностью. У всех сортов отчетливо проявлялись зоны с малоподвижной, среднеподвижной и подвижными формами. Стресс, связанный с почвенной засухой привел к увеличению гетерогенности ГТР, за счет образования новых мало- и средноподвижных форм. Очевидно, адаптивная перестройка энзиматической системы пшеницы сопровождается синтезом множественных форм ГТР с новыми свойствами. Экспрессия генов является быстрым ответом на воздействия стрессовых факторов. Возможно, в ответ на продолжительную засуху происходит повышение экспрессивности отдельных изоформ глутатионредуктазы в листьях у всех исследованных генотипов.

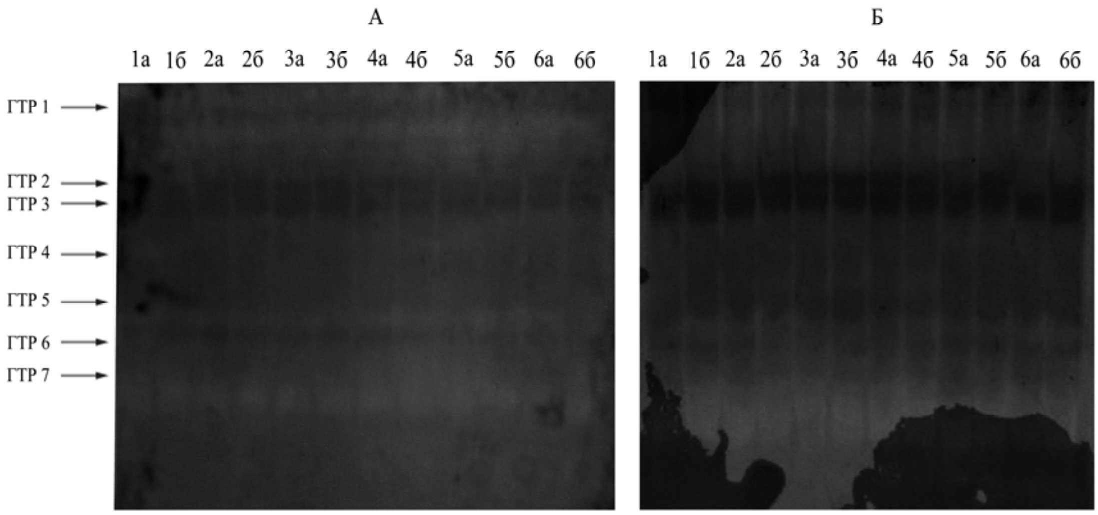


Рис. 5. Электрофоретические спектры глутатионредуктазы листьев пшеницы, выращенных в условиях почвенной засухи. а – полив, б – засуха; 1 – Гарагылчыг-2, 2 – Гырмызы гюль-1, 3 – Азаматлы-95, 4 - Гийматли-2/17, 5 – Баракатли-95, 6 – Гырмызы бугда. Электрофорез был проведен в 7%-ном ПААГ в Трис-глициновом буфере, pH 8,3, при 4°C, 3 часа при стабильном токе 30 мА. Количество нанесенного белка составляло 40 мкг на дорожку геля.

В литературе имеются противоречивые данные об изменение активности глутатионредуктазы при стрессовых условиях. При воздействии различных концентраций NaCl (50, 100, 150, 200 мМ) на активность ГТР у двух сортов пшеницы, наблюдалось уменьшение активности фермента (Esfandiari et al., 2007). Увеличение активности ГТР установлено при долговременном засолении многолетней травы *Pennisetum clandestinum* (Muscolo et al., 2003). Янарели и др. (Yanarelli et al., 2007) обнаружили, что обработка Cd приводила к увеличению активности ГТР в листьях и в корнях пшеницы (*Triticum aestivum* L.), выращенных при умеренно токсичной концентрации кадмия (100 мкМ).

Таким образом, на основании полученных нами (Huseynova et al., 2010; Huseynova, 2012) и литературных данных (Dat et al., 2000; Dash and Mohanty, 2002) можно заключить, что засуха приводит к увеличению активности АПО, СОД, КАТ и ГТР в листьях пшеницы по сравнению с исходным уровнем. Наиболее заметно увеличивался АПО и ГТР, что указывает на интенсивную работу аскорбат-глутатионового цикла, в котором происходит разрушение H_2O_2. Сравнение показателей окислительного стресса и активности антиоксидантных ферментов в условиях водного стресса может быть удобным диагностическим критерием для оценки устойчивости растений к засухе.

Анализ изменений активности и множественных молекулярных форм антиоксидантных ферментов требует более углубленных исследований. Необходима оценка роли отдельных изоформ ферментов с учетом их компартментации в клетке.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта (EIF-2011-1(3)-82/48/3) Фонда развития науки при Президенте Азербайджанской Республики.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Бараненко В.В. (2006) Супероксиддисмутаза в клетках растений. Цитология, **48:** 465-474

Мерзляк М.Н. (1989) Активированный кислород и окислительные процессы в мембранах растительной клетки. Итоги науки и техники. Сер. Физиология растений. М.: ВИНИТИ, **6:** 167 с.

Николаева М.К., Маевская С.Н., Шугаев А.Г., Бухов Н.Г. (2010) Влияние засухи на содержание хлорофилла и активность ферментов антиоксидантной системы в листьях трех сортов пшеницы, различающихся по продуктивности. Физиология Растений, **57:** 94-102

Abedi T., Pakniyat H. (2010) Antioxidant enzyme changes in response to drought stress in ten cultivars of Oil seed rape (*Brassica napus* L.). Czech J. Genet. Plant Breed., **46(1):** 27-34

Al-Ghamdi A.A. (2009) Evaluation of oxidative stress tolerance in two wheat (*Triticim aestivum*) cultivars in response to drought. International Journal of Agriculture and Biology, **11:** 7-12

Aliev J.A. (2001) Physiological bases of wheat breeding tolerant to water stress. Proceedings of the 6th International Wheat Conference, Budap-

est, Hungary, 2000. In: Wheat in a Global Environment (Bedo Z., Lang L., eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London **9:** 693-698.

Aliyev J.A. (2012) Physiological and molecular bases of drought tolerance in wheat (*Trticum* L.) genotypes. In: D.F. Neves, J.D. Sanz (eds.) Environmental Science, Engineering and Technology. Drought: New Research, Nova Science Publishers, Inc., New York, **2:** 47-95

Anderson M., Prasad T., Stewart C. et al. (1995) Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glytathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. Plant Physiol., **109:** 1247-1257

Asish K., Bandhu P., Das A. (2005) Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. Ecotoxicology and Environmental Safety, **60:** 324-349

Bechtold U., Richard O., Zamboni A. et al. (2008) Impact of chloroplastic- and extracellular-sourced ROS on high light-responsive gene expression in *Arabidopsis*. J Exp. Botany, **59:** 121-133

Breusegem F. (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. Cell. Mol. Life Sci., **57:** 779-795.

Bunkelman J., Trelease R. (1996) Ascorbate peroxidase: a prominent membrane protein in oilseed glyoxysomes. Plant Physiol., **110:** 589-598

Chatzidimitriadou K., Nianiou-Obeidat I., Madesis P. et al. (2009) Expression of SOD transgene in pepper confers stress tolerance and improves shoot regeneration. Electronic Journal of Biotechnology, **12(40):** 1-9

Dash S, Mohanty N. (2002) Response of seedlings to heat-stress in cultivars of wheat: growth temperature-dependent differential modulation of photosystems 1 and 2 activity, and foliar antioxidant defense capacity. Journal of Plant Physiology, **159:** 49-59.

Dat, J., Vandenabeele S., Vranová E. et al. (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. Cell Mol. Life Sci., **57(5):** 779-95

El-Fadly G.A.B., Menshawy A.M., Farhat W.Z.E. (2007) Molecular and biochemical studies on some bread wheat genotypes in relation to water stress tolerance. African Crop Science Conference Proceedings, **8:** 605-612

Esfandiari E., Shekari F., Esfandiari M. (2007) The effect of salt stress on antioxidant enzymes activity and lipid peroxidation on the wheat seedlings. Not. Bot. Agrobot. Cluj., **35:** 48-56

Fu J., Huang B. (2001) Involvement of antioxidants and lipid peroxidation in the adaptation of two cool-season grasses to localized drought stress. Environm. and Experimen. Botany, **45:** 105-114

Gomez J., Jimenez A., Olmos E., Sevilla F. (2004) Location and effects of long-term NaCl stress on superoxide dismutase and ascorbate peroxidase isoenzymes of pea (*Pisum sativum* cv. Puget) chloroplasts. J. Exp. Botany, **55:** 119-130

Huseynova I.M. (2012) Photosynthetic characteristics and enzymatic antioxidant capacity of leaves from wheat cultivars exposed to drought. Biochimica et Biophysica Acta, **1817:** 1516-1523

Huseynova I.M., Suleymanov S.Y., Rustamova S.M. (2010) Response of photosynthetic apparatus and antioxidant defense systems in *Triticum aestivum* L. genotypes subjected to drought stress. Proceedings of ANAS (Biological Sciences), **65(5-6):** 49-59

Ishikawa T., Yoshimura K., Sakai K. et al. (1998) Molecular characterization and physiological role of a glyxisome-bound ascorbate peroxidase from spinach. Plant Cell Physiol., **39:** 23-34

Iturbe-Ormaetxe I., Escuredo P., Arrese-Igor C., Becana M. (1998) Oxidative damage in pea plants exposed to water deficit or paraguat. Plant Physiol., **116:** 173-181

Khan N., Naqvi F.N. (2010) Effect of water stress on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in local bread wheat hexaploids. Journal of Food, Agriculture and Environment, **8(2):** 521-526

Laemmli U. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T_4. Nature, **227:** 680-685

Luna C., Pastori G., Driscoll S. et al. (2004) Drought controls on H_2O_2 accumulation, catalase (CAT) activity and CAT gene expression in wheat. J. Exp. Bot., **56:** 417-423

Mittler R., Zilinskas B. (1993) Detection of ascorbate peroxidase activity on native gels by inhibition of the ascorbate dependent reduction of nitro blue tetrazolium. Anal. Biochem., **212:** 540-546

Mittler R., Zilinskas B. (1992) Molecular cloning and characterization of a gene encoding pea cytosolic ascorbate peroxidase. J. Biol. Chem., **267:** 21802-21807

Mittova V., Tal M., Volokita M., Guy M. (2003) Up-regulation of the leaf mitochondrial and peroxisomal antioxidative systems in response to salt-induced oxidative stress in the wild salt-tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii*. Plant Cell Envir., **26:** 845-856

Muscolo A., Sidari M., Panuccio M. (2003) Tolerance of kikuyu grass to long term salt stress is associated with induction antioxidant defenses. Plant Growth Regulation, **41:** 57-62

Navari-Izzo F., Quartassi M., Pinzino C. et al. (1998) Thylakoid-bound and stromal enzymes in wheat treated with excess copper. Physiol. Plant., **104:** 630-638

Parida A., Das A., Mohanty P. (2004) Defense

potentials to NaCl in a mangrove *Bruguiera parviflora*: differential changes of isoform of some antioxidative enzymes. J. Plant Physiol., **161:**531-542

Passioura J.B., Angus J.F. (2010) Improving productivity of crops in water-limited environments. Advances in Agronomy, **106:** 37-75

Racchi M.L., Bagnoli F., Balla I., Daut S. (2001) Differential activity of catalase and superoxide dismutase in seedlings and *in vitro* micro propagated Oak (*Quercus robur* L.). Plant Cell Reports, **20:** 169-174

Rao M.V., PaliyathG., Ormrod D.P. (1996) Ultraviolet-B- and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol., **110:** 125-136

Sairam R.K., Chandrasekar V., Srivastava G.C. (2001) Comparison of hexaploid and tetraploid wheat cultivars in their responses to water stress. Biologia-plantarum, **44(1):** 89-94

Santos C., Campos A., Azevedo H., Caldeira G. (2001) In situ and in vitro senescence induced by KCl stress: nutritional imbalance, lipid peroxidation and antioxidant metabolism. J. Exp. Bot., **52:** 351-360

Sayar R., Khemira H., Kameli A.., Mosbahi M. (2008) Physiological tests as predictive appreciation for drought tolerance in durum wheat (*Triticum durum* Desf.). Agronomy research, **6(1):** 79-80

Scandalios J.G. (1993) Oxygen stress and superoxide dismutase. Plant Physiol., **101:** 7-12

Sedmak J.J., Grossberg S.E. (1977) F rapid, sensitive and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G 250. Anal. Biochem., **79:** 544-552

Tas S., Tas B. (2007) Some physiological responses of drought stress in wheat genotypes with different ploidity in Turkiye. World Journal of Agricultural Scinces, **3:** 178-183

Yannarelli G.G., Fernandez-Alvarez A.J., Santa-Cruz D.M., Tomaro M.L. (2007) Glutathione reductase activity and isoforms in leaves and roots of wheat plants subjected to cadmium stress. Phytochemistry, **68:** 505-512

Zhang J., Kirkham M. (1994) Drought-stress-induced changes in activities of superoxide dismutase, catalase and peroxidase in wheat species. Plant Cell Physiol., **35:** 785-791

Zhang Q.H., Liu H.S., Meng F.T. et al. (2000) The effect of drought stress on physiological characters of leaves and seed-filling characteristics of the new wheat cultivar Yamai 36 during the late developmental stage. Scientia Agricultura Sinica, **33(4):** 94-96

İ.R. Hüseynova, D.R. Əliyeva, C.Ə. Əliyev

Torpaq Quraqlığına Məruz Qalmış Buğda Bitkisində
Antioksidant Fermentlərin Elektroforetik Spektrlərinin Dəyişməsi

Təbii quraqlığın buğda bitkisində antioksidant fermentlərin aktivliyinə təsirini öyrənmək məqsədi ilə sahə şəraitində böyüdülmüş altı müxtəlif yumşaq (*Triticum aestivum* L.) və bərk (*Triticum durum* Desf.) buğda genotipləri üzərində tədqiqatlar aparılmışdır. Nativ PAAG elektroforez metodunun köməyi ilə quraqlığa məruz qalmış buğda yarpaqlarında katalaza fermentinin bir, superoksiddismutazanın altı, askorbatperoksidazanın və qlutationreduktazanın isə hərbirinin yeddi izoforması aşkar olunmuşdur. Göstərilmişdir ki, bugda bitkisində əsas antioksidant fermentlərdən biri olan superoksiddismutazanın hər üç izoforması – Mn-, Fe-, Cu/Zn-SOD fəaliyyət göstərir. Belə qənaətə gəlinmişdir ki, quraqlıq stresi buğda yarpaqlarında APO, SOD, KAT, QTR fermentlərinin aktivliklərinin ilkin vəziyyətlə müqayisədə artmasına səbəb olur. APO və QTR fermentlərinin aktivlikləri daha nəzərəçarpacaq dərəcədə artmışdır ki, bu da stress şəraitində hidrogen peroksidin parçalanmasını həyata keçirən askorbat – qlutation tsiklinin daha intensiv işləməsi ilə əlaqədardır.

I.M. Huseynova, D.R. Aliyeva, J.A. Aliyev

Changes of Electrophoretic Spectra of Antioxidant Enzymes in Wheat Genotypes Subjected to Soil Drought

Experiments with 6 contrasting bread (*Triticum aestivum* L.) and durum (*Triticum durum* Desf.) wheat genotypes grown under field conditions have been carried out to study the effect of soil drought on antioxidant enzyme activities. Native polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) revealed the presence of 1 isoform of catalase, 6 isoforms of superoxide dismutase, 7 isoforms of ascorbate peroxidase and 7 isoforms of glutathione reductase in wheat leaves during drought. Mn-, Fe-, Cu/Zn containing isoforms of one of the key antioxidant enzymes - superoxide dismutase-were shown to function in wheat plants. It was concluded that drought caused increases in APO, SOD, CAT and GR activities in wheat leaves compared with their initial levels. Increases in APO and GR activities were more pronounced, indicating an intense work of the ascorbate-glutathione cycle, which breaks down H_2O_2.